

26208

TECNICAS, MATERIALES Y METODOS UTILIZADOS EN LA EVALUACION DE FRIJOL POR SU REACCION A LAS ENFERMEDADES

Marcial Pastor Corrales

El cultivo de frijol, Phaseolus vulgaris, en cualquier región del mundo está expuesto a factores climáticos, biológicos y edáficos que afectan su rendimiento. De estos factores, las enfermedades de este cultivo, en su mayoría causadas por hongos, virus y bacterias, son uno de los limitantes que más contribuyen a su bajo rendimiento en América Latina y muchas otras regiones del trópico.

Las estrategias o sistemas que existen para el control o manejo de las enfermedades del frijol son varios e incluyen buenas prácticas culturales, rotación de cultivos, siembra de semilla limpia producida en ambientes o regiones libres del patógeno, uso de productos químicos, utilización de variedades resistentes y una combinación de estas estrategias. Sin embargo, como en la mayoría de las regiones del trópico, el frijol es un cultivo de agricultores que poseen pequeñas propiedades, con ingresos limitados y además es un cultivo de riesgo, no se puede considerar para el control de las enfermedades de este cultivo, estrategias que impliquen altos costos para el agricultor; por lo tanto, el uso de variedades resistentes debe ser un componente muy importante de esta estrategia.

La utilización de variedades resistentes implica que existen metodologías confiables que permiten diferenciar a estas variedades de aquellas que son susceptibles. Para ese fin, es necesario evaluar de una manera adecuada al frijol en el campo o invernadero por su reacción a las enfermedades.

La evaluación de germoplasma de frijol por su reacción a las enfermedades básicamente implica juntar en un mismo lugar los tres factores necesarios para que dicha evaluación o selección de germoplasma resistente sea posible. Estos factores son:

1. El germoplasma de frijol que se desea evaluar ya sea como variedades comerciales, germoplasma avanzado y uniforme o como germoplasma segregante.
2. El patógeno o patógenos causantes de las enfermedades en estudio. Se debe tener en cuenta que el cultivo a evaluarse debe ser expuesto a una variación adecuada y representativa de las poblaciones del patógeno que existen en el área de interés.
3. El ambiente apropiado que permita el desarrollo del patógeno y el progreso de la enfermedad o enfermedades a evaluarse.

La interacción resultante entre la planta de frijol y el patógeno en un ambiente adecuado es lo que se evalúa. Esta interacción tiene diferentes manifestaciones y el valor que se asigna a cada manifestación variará según el objetivo de la evaluación. Las manifestaciones posibles de esta interacción son:

1. La ausencia de síntomas de la enfermedad en el germoplasma a evaluarse; o sea lo que se denomina inmunidad.
2. La presencia de la enfermedad y los grados en que se presenta; que puede cuantificarse indicando el número de plantas enfermas o indicando la cantidad de tejido vegetal afectado por la enfermedad.

3. El efecto de la enfermedad en el rendimiento.
4. La interacción frijol-patógeno, que se puede manifestar como el tipo de lesión, o tipo de pústula en el caso de la roya. Tanto la lesión como la pústula pueden ser grandes o pequeñas, con o sin esporulación, rodeada o no de halo clorótico, etc.

El objetivo o reto del científico es entonces el de proveer diseños prácticos y útiles que permitan evaluar la interacción de la planta de frijol con sus patógenos. En algunos programas la simple identificación de germoplasma altamente resistente o sin síntomas (inmune) es suficiente para sus objetivos. Sin embargo, con algunos patógenos que son altamente variables, es necesario tener otros tipos de mecanismos de resistencia y también más variación en el germoplasma que se utiliza ya sea como fuente de resistencia o como variedad comercial. Entonces, los diseños que se utilizan para evaluar el germoplasma variarán de acuerdo a los objetivos.

La mayoría de las evaluaciones de germoplasma de frijol por su reacción a las enfermedades se hacen en el campo pero también se realizan en el invernadero.

Cuando se realicen evaluaciones de germoplasma de frijol en el campo, es necesario en la medida que sea posible hacer la evaluación en un lugar que sea representativo de la zona frijolera. Para el caso de los patógenos del frijol es importante hacerlo en un lugar donde las condiciones climáticas permitan que la enfermedad o enfermedades que generalmente atacan al cultivo en la región, se puedan presentar. Por ejemplo, si la zona de interés es de clima más o menos frío, con adecuada precipitación y donde las enfermedades que predominan año tras año son la antracnosis, la ascochyta y el añublo de halo, la evaluación debe hacerse en un campo de la zona de interés donde estas tres enfermedades se presentan, de una manera más o menos representativa de la zona.

Si la evaluación se hace en un campo donde la severidad de las enfermedades es muy baja comparada con el promedio de la zona, es muy probable que se seleccione germoplasma que aparentemente es adecuado (resistente), pero que posteriormente será severamente atacado cuando se siembre comercialmente en un campo que si es representativo de la zona y donde los ataques de la enfermedad son más severos. De una manera similar, si la evaluación se hace en un campo donde la severidad de la enfermedad es extremadamente alta y además no es representativa de la zona de interés, se corre el riesgo de eliminar mucho germoplasma de frijol que es adecuado para la zona.

También debe tenerse en cuenta que la variación de algunos patógenos es bastante amplia, entonces debe exponerse el germoplasma que se evalúa a una población del patógeno que es representativa de la variación del patógeno.

Una manera de saber si la evaluación de germoplasma de frijol que se conduce es adecuada, ya sea por la intensidad que la enfermedad presente o si la representación de las poblaciones del patógeno es apropiada, es usando testigos. Lo más recomendable es el uso de variedades de frijol muy conocidas y cuya reacción a una enfermedad de un año a otro en la zona de interés es conocida. Para volver al ejemplo anterior de la zona frijolera donde las enfermedades que predominan son la antracnosis, la ascochyta y el añublo de halo, se debe utilizar unos tres testigos para cada enfermedad que incluya un testigo resistente, un intermedio y un

susceptible. Estos testigos se sembrarán por todo el campo para conocer sobre la distribución de la enfermedad y de su grado de severidad. El uso de testigos conocidos es muy importante.

También se recomienda la siembra por todo el campo de variedades susceptibles que atraigan a los patógenos que existen en las zonas. A estas variedades se les denomina esparcidores y su función es precisamente atraer y esparcir de una manera uniforme y adecuada las enfermedades en el campo de evaluación. Los esparcidores pueden ser sembrados con dos o tres semanas de anticipación para asegurar la presencia de inóculo.

Muchas veces es posible y necesario hacer también inoculaciones artificiales con los patógenos de interés. La gran ventaja de esta práctica es que si se hace de una manera adecuada, se tiene muy alta probabilidad de tener presente la enfermedad en el campo de evaluación y por lo tanto de tener una buena evaluación y selección. Esta práctica evita los escapes que son muy comunes cuando la enfermedad no está adecuadamente distribuida por el campo o cuando la enfermedad no se presenta porque el inóculo natural en el campo es muy bajo, o porque no hubo condiciones ambientales adecuadas que permitan un ataque más representativo. Cuando se hacen inoculaciones artificiales, también se debe tener en cuenta el uso de poblaciones representativas del patógeno con el que se inocula y que la severidad de la enfermedad sea adecuada. Nuevamente la utilización de testigos conocidos permitirá saber si estos dos criterios están siendo apropiadamente utilizados. El método de inoculación, la cantidad de inóculo, la edad de la planta al momento de la inoculación, son factores muy importantes que se deben tener en cuenta y que varían según la enfermedad con la que se trabaje.

A continuación se hace una descripción de algunos factores que se deben tener en cuenta cuando se hacen inoculaciones artificiales con algunos patógenos del frijol y que incluye:

1. Manejo del patógeno: aislamiento en cultivo puro, producción y cuantificación de la concentración del inóculo a utilizarse.
2. Método(s) de inoculación.
3. Manejo de plantas a evaluarse: edad al inocularse, uso de testigos, etc.
4. Condiciones ambientales para que se desarrolle la enfermedad.

Finalmente se hace también una descripción de las escalas de evaluación, criterios y filosofía de evaluación de germoplasma de frijol por su reacción, ya sea de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades.

Técnicas para el aislamiento, conservación, incremento de inóculo, e inoculación de plantas de frijol con algunos de sus patógenos.

Roya

El patógeno que causa la roya del frijol, Uromyces phaseoli (= U. appendiculatus) es un parásito obligado o biotrofo; por lo tanto no es posible producir inóculo de este organismo en un medio artificial en el laboratorio. Sin embargo, es posible hacer inoculaciones artificiales utilizando uredosporas del patógeno colectadas de plantas con roya.

Colección de uredosporas

Dos métodos han sido utilizados con éxito por el programa de frijol del CIAT para conseguir inóculo del patógeno de la roya:

- a. Recolección de uredosporas de plantas con roya en condiciones de campo.
- b. Recolección de uredosporas de plantas con roya producidas en el invernadero.

Para la recolección de uredosporas en condiciones de campo, primero se identifican las plantas con roya y luego se procede a la colección manual de estas esporas utilizando un tamiz N° 200 (U.S.A. Standard Testing Sieve, Arthur H. Thomas Company) por el que pasan las uredosporas del patógeno pero no los residuos de las hojas. Al tamiz se le coloca una lámina sin poros donde se acumulan las uredosporas. Las hojas de frijol que muestran pústulas esporulantes de roya se golpean suavemente contra la malla del tamiz, las esporas pasan por el tamiz y se acumulan en la lámina ubicada bajo éste. Este método es muy práctico y sencillo ya que las uredosporas de roya coleccionadas se pueden utilizar inmediatamente para inocular el germoplasma que se desea evaluar o se pueden almacenar para ser usadas mas tarde. Se debe coleccionar uredosporas de diferentes plantas y campos para asegurarse de que se colecciona toda la variación presente en las poblaciones del patógeno. La única gran desventaja de este método, es cuando no hay en el campo plantas infectadas con roya para conseguir inóculo y no se tienen uredosporas almacenadas. En estos casos se recomienda el segundo método o sea el de producir uredosporas en condiciones de invernadero.

Para obtener uredosporas del patógeno de la roya en el invernadero, primero se siembran plantas de frijol de variedades susceptibles a la roya en potes de 10 x 10 cm. Se recomienda 3 plantas por pote, las que se inoculan 9 días después de la siembra. Como inóculo inicial se utilizan unas cuantas hojas que tengan roya, las que se lavan en un recipiente con agua al que previamente se le agregó tween 20% al 0.02%. Las uredosporas presentes en las pústulas al caer al agua forman el inóculo, que tiene apariencia marrón. El inóculo se aplica a las plantas con una bomba manual o con una bomba al vacío (15 lb/ pulgada² presión). Después de inoculadas, las plantas se colocan para ser incubadas por 24 horas en una cámara con humidificadores y que tiene 100% HR y alrededor de 22°C de temperatura. Posteriormente, las plantas se retiran de la cámara humeda para trasladarlas a mesas en el invernadero. Aquí las plantas se asperjan diariamente con agua unas cuatro veces por día durante 5 días. Después de 10 días de la inoculación, las plantas muestran muchas pústulas de roya con abundante esporulación. De una maceta con 3 plantas se obtienen 6 hojas primarias infectadas que producen aproximadamente 125 mg. de uredosporas. Estas uredosporas pueden ser utilizadas para inocular el germoplasma que se desea evaluar o se pueden almacenar para ser utilizadas más tarde.

Preservación de uredosporas

Si se almacenan las uredosporas, éstas deben ser guardadas en tubos de ensayo tapados con algodón. Estos tubos, se introducen en otros tubos más grandes que contengan cloruro de calcio para facilitar la desecación y así preservar la viabilidad de las uredosporas hasta un mes. Si los tubos además de tener cloruro de calcio se colocan a 5°C, la viabilidad de las

uredosporas puede aumentarse de 2 a 4 meses. Para preservarlas por más tiempo es necesario conservar las uredosporas en nitrógeno líquido o liofilizarlas.

Inoculación

Para la inoculación de las plantas que se deseen evaluar, se utilizan las uredosporas frescas o las preservadas, las que se suspenden en agua destilada en proporción de 1.5 mg. por cada 10 cc de agua. Para obtener una mejor dispersión de las uredosporas en el agua se agregan un par de gotas de "tween 20" por cada litro de suspensión. Si se utiliza un hemacitómetro es posible cuantificar el inóculo y obtener así la concentración que se recomienda que es de 30,000 esporas por cada mililitro de agua. Esta concentración generalmente da muy buenos resultados. Si no se tiene hemacitómetro se puede estimar que 3 gramos de uredosporas por cada 12 litros de agua resulta más o menos en una concentración de 30,000 uredosporas/ml de agua. Entonces para inocular una hectárea de frijol se necesitan 36 gramos de uredosporas.

Una vez preparado el inóculo, éste se asperja sobre las plantas en el campo, utilizando una bomba micronizer tratando de que las plantas queden humedecidas en su totalidad y de preferencia cuando el sol ya se haya ocultado. En el invernadero las uredosporas se asperjan sobre el haz y el envés de las hojas con una bomba neumática (bomba al vacío) a una presión de 15 lb/pulg²); después las plantas inoculadas se colocan en una cámara húmeda por 24 horas; posteriormente se colocan las plantas en una mesa del invernadero donde después de 10 días se observarán síntomas visibles de roya.

Antracnosis

Aislamiento

Para el aislamiento del hongo que causa la antracnosis, Colletotrichum lindemuthianum, se puede proceder de la forma como se indica en la guía de estudio del CIAT "Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol".

Inoculación

Antes de una inoculación, debe incrementarse el hongo a partir de un aislamiento puro, cuando este se encuentre bien esporulado en PDA, lo cual puede verificarse por las masas rosadas de conidias presentes sobre el micelio. El inóculo se puede incrementar de varias formas:

1. Utilizando una espátula previamente esterilizada, se procede a cortar pedacitos de micelio de 3-5 mm de diámetro, preferiblemente del borde de las colonias en PDA, los que se transfieren a otra caja de petri con PDA. De 1-4 pedacitos es suficiente para obtener una buena cantidad de esporas. Las nuevas cajas Petri con el hongo deben ser incubadas a 18-21°C, así se tiene buen crecimiento y esporulación. Este método se usa preferiblemente para inoculaciones en invernadero, en donde no se necesita gran cantidad de esporas.

2. El inóculo también puede incrementarse, colocando hojas de frijol previamente esterilizadas sobre el PDA. Para esto, una vez listas las cajas con PDA en condiciones asépticas, se pueden colocar las hojas de frijol esterilizadas sobre el PDA. Después a partir de una caja con el hongo bien esporulado, puede prepararse una suspensión de esporas bien concentrada. Para esto se puede agregar a la caja cierto volumen de Dextrosa al 1% o agua destilada estéril dependiendo de la cantidad de inóculo que quiera producirse. Una vez agregada la Dextrosa usando una espátula pueden rasparse las esporas para preparar la suspensión. Se puede homogenizar dicha suspensión mediante una pipeta. Una vez homogenizada, se agregan en cada caja sobre las hojas de frijol de 5-10 gotas de la suspensión y se esparcen bien sobre la hoja con ayuda de una varilla de vidrio doblada, esterilizada antes de usarse. De esta manera, las cajas pueden incubarse a una temperatura de 18-21°C y a los 4-7 días se tendrá gran producción de esporas sin desarrollo de micelio.

Para inoculaciones en campo, donde se necesita mayor cantidad de inóculo, éste puede incrementarse en grandes cantidades utilizando erlenmeyers con vainas de frijol estériles. Se recogen del campo vainas verdes de cualquier variedad donde no esté formado totalmente el grano, colocándolas hasta un poco más de la mitad de erlenmeyers de 125-250 o 500 ml; las vainas pueden colocarse enteras o partidas, una vez llenos los frascos, se les agrega 10-20 o 40 ml de agua para los erlenmeyers de 125-250 o 500 ml respectivamente. Esto se hace para que en la esterilización, el vapor del agua haga más eficiente dicha esterilización. Los erlenmeyers una vez listos, se tapan con algodón y papel aluminio cubriendo el algodón, para esterilizarlos a 121°C durante 30 minutos. Después de estériles, se puede incrementar el inóculo a partir de una caja con producción abundante de esporas, para lo cual se hace con Dextrosa al 1% una suspensión bien concentrada en la caja y mediante una pipeta pasteur, se agregan media pipeta (1 ml), una pipeta y dos pipetas para los erlenmeyers de 125-250 y 500 ml respectivamente de la suspensión bien concentrada. De una caja con aislamiento pueden sembrarse entre 20-40 erlenmeyers dependiendo de lo concentrada que quede la suspensión. Los erlenmeyers se incuban a 18-21°C por 7-10 días, para lo cual estarán listos para la inoculación, habiendo esporulado bastante.

Nota: Para evitar, contaminaciones con bacterias puede agregarse a la Dextrosa, al momento de incrementar el inóculo en las vainas, sulfato de estreptomycin en 2.00 ppm ó ácido láctico al 25% o a razón de 2-5 gotas por cada caja Petri según el tamaño de la caja y el volumen del medio por caja.

El agua sobrante después de la esterilización de los erlenmeyers con las vainas, al momento de incrementar el inóculo, debe sacarse del erlenmeyer.

Preparación del inóculo

Para inoculaciones en el invernadero, se debe incrementar el inóculo, usando cualquiera de los métodos descritos. Para esto, pueden rasparse las esporas de las cajas con sólo PDA ó de las cajas con PDA y hojas de frijol ó también se puede licuar el contenido de estas cajas. Luego debe pasarse el inóculo por una gasa con el fin de eliminar el micelio contenido en el medio y que la suspensión quede basada en esporas del hongo y después se procede a hacer lectura de concentración en un hematómetro para determinar qué concentración tiene este volumen inicial

de inóculo preparado y así proceder a diluir el inóculo hasta obtener la concentración deseada o adecuada que para el caso de *C. lindemuthianum* es de 1.2×10^6 conidias/ml. La dilución del inóculo se hace usando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} V_o C_o &= V_f C_f & V_o &= \text{Volumen inicial} \\ & & C_o &= \text{Concentración inicial} \\ v_f &= \frac{V_o C_o}{C_f} & V_f &= \text{Volumen final} \\ & & C_f &= \text{Concentración final } (1.2 \times 10^6 \text{ conidias/ml.}) \end{aligned}$$

Para inoculaciones en el campo, usando incremento de inóculo producido en vainas, una vez listo el inóculo en los erlenmeyers, se procede a licuar las vainas, recogiendo el licuado después en varias gasas para colar todos los residuos de las vainas, tratando de que la suspensión del inóculo sea básicamente esporas.

Luego se procede a leer la concentración con ayuda del hemacitómetro y a la dilución respectiva del inóculo, utilizándose la misma concentración ya mencionada o sea 1.2×10^6 esporas/ml. En nuestra experiencia con inoculaciones de plantas de frijol con el patógeno de la antracnosis en el campo, generalmente estamos utilizando, para inocular una hectárea de frijol, 120 erlenmeyers de inóculo cuando se tienen erlenmeyers de 250 cc y se aplican 12 bombas a una hectárea del cultivo. Esto con bombas micronizer de 12 litros de capacidad.

El inóculo debe prepararse en base a una mezcla de aislamientos presentes y representativos de la región cuando va a realizarse en el campo ó de varias regiones cuando va a realizarse en el invernadero; si se tienen identificación de razas por aislamiento, la mezcla debe ser hecha en base a las razas presentes.

Métodos de inoculación

Para las inoculaciones en invernadero, estas se efectúan en plantas de 8 días de sembradas inoculándose con inyección de la suspensión en el tallo un centímetro abajo de los cotiledones, en dirección inclinada hacia abajo, dejando una gota de suspensión a cada lado del tallo por donde penetró y salió la aguja. Después de inocular las plantas con inyección, se inoculan con aspersión, para lo cual puede usarse un compresor que asperje la suspensión a una presión de 10-15 lb/pulg², asperjando las hojas cotiledonares por el haz y el envés. Después de inoculadas, las plantas deben colocarse en una cámara húmeda con 85-100% de humedad relativa y a una temperatura entre 18-22°C, incubándose allí hasta el momento de la evaluación, la cual se hace 7 días después de la inoculación.

Cuando se inocula en el campo, las plantas se asperjan mediante bombas micronizer tratando de que las plantas queden humedecidas en su totalidad. Las inoculaciones se hacen desde cuando las plantas tengan 2-3 hojas trifoliadas y se repiten cada 10 días hasta la aparición severa de síntomas. Las inoculaciones deben hacerse en condiciones de alta humedad y bajas temperaturas, por lo que se recomienda hacerlas después de las cuatro de la tarde. También agregar un dispersante y/o adherente a la suspensión de inóculo, (más o menos 5 gotas de tween 20 por litro de inóculo).

Mancha Angular

Esta enfermedad es causada por Isariopsis griseola

Aislamiento

Para aislar el hongo, se usa el medio sintético conocido como V-8 el cual está hecho de:

Jugo de vegetales V-8	200 ml.
Carbonato de calcio	3 gms.
Agar	18 gms.
Agua destilada	800 ml.

Las técnicas de aislamiento son diferentes a las técnicas usadas para Colletotrichum lindemuthianum, debido a que Isariopsis griseola es un hongo de mayor dificultad para aislar, crecer y esporular.

La técnica de los triángulos de AGAR-AGUA consiste en tomar triángulos pequeños de AGAR-AGUA en una espátula previamente desinfectada. Con ayuda de un estereoscopio se rozan las conidias en los sinemas que se encuentran sobre las lesiones en el envés de las hojas, sin tocar la superficie de la hoja, para luego colocar estos trozos de AGAR-AGUA sobre el medio V-8. Las colonias individuales que crezcan, se usan para incrementar el inóculo.

Incremento del hongo

A las colonias desarrolladas en el V-8, se les puede agregar unas gotas de dextrosa al 1% sobre la colonia y usando una espátula, se raspa dicha colonia, formando una suspensión de esporas. Con una pipeta, Se procede a pasar de 4-6 gotas de dicha suspensión a nuevas cajas con V-8, para esparcirlas en el medio con un vidrin doblado estéril y tratando de cubrir toda la superficie del medio, ya que el hongo tiene un crecimiento vertical por lo cual no se extiende donde no se siembra.

Para las inoculaciones se puede incrementar el hongo en gran cantidad, a partir de una caja de 8-10 días de crecimiento cuando el hongo ha esporulado bastante y que cubra toda la superficie de la caja, haciéndolo de la misma forma que a partir de una colonia, o sea raspando las esporas con dextrosa al 1%, homogenizando la suspensión y colando de 4-6 gotas de la suspensión sobre nuevas cajas con V-8 para extenderlas sobre el medio. El hongo debe incubarse a 19-24°C; para obtener mayor esporulación, se envuelven las cajas Petri en papel aluminio.

Inoculación

A partir de las cajas bien esporuladas, se recolectan las esporas en un volumen de agua, raspándolas con una espátula. Si la suspensión presenta mucho micelio se recomienda pasar el inóculo por una gaza, para dejar en suspensión las conidias del hongo. Listo el inóculo, se lee la concentración en el hemacitómetro y se diluye hasta 2×10^4 conidias/ml. Generalmente 2 cajas Petri con buena esporulación del hongo arrojan más o menos 1 litro de inóculo de 2×10^4 conidias/ml de agua; o sea que para inocular una hectárea a la que se le aplican 12 bombas de inóculo, se necesitan por lo menos 288 cajas Petri bien esporuladas. Se usan bombas micronizer de 12 litros de capacidad.

Métodos de inoculación

Para inoculaciones en invernadero se usan plantas con 2-3 hojas trifoliadas (17-20 días de sembradas), las cuales se asperjan mediante una bomba de presión a 10-15 lb/pulg² usando tritón AE al 0,1% en la suspensión de conidias, tratando de asperjar el haz y el envés de las hojas. Una vez inoculadas las plantas, éstas se incuban de 2-4 días en una atmósfera con 80-100% de humedad y 18-22°C, para luego colocarlas en un ambiente fresco, hasta la aparición de síntomas 8-12 días después.

Para inoculaciones en campo, el hongo se incrementa en cajas de la misma forma que para invernadero, asperjándose la suspensión de esporas con una bomba micronizer sobre las plantas cuando estas tengan 2-3 hojas trifoliadas y repitiendo las inoculaciones cada 10 días hasta la aparición de síntomas.

Sclerotium rolfsii

Aislamiento y purificación

Se hace cortando pequeños trocitos de raíces o tallos infectados por el hongo y desinfectándolos tres minutos en hipoclorito de sodio a 0.5%, después lavarlos un minuto en agua destilada estéril, (ésto es para efectuar la desinfección superficial de las raíces).

Después se coloca el material vegetal (pedacitos de raíces) en cajas de petri con PDA (papa-dextrusa-agar) y se colocan dentro de una incubadora a 19-25°C, después de 3-4 días se transfiere tomando trocitos de micelio y sembrándolos en una nueva caja con PDA para purificar el patógeno y ponerlo en la misma temperatura antes mencionada. Este procedimiento también se usa para Rhizoctonia solani y Fusarium sp.

Incremento del inóculo

Se siembran esclerocios maduros en cajas de petri, las cuales pueden rendir unos doscientos esclerocios por caja; luego se mezclan en una concentración de quinientos esclerocios por litro de suelo o arena, se siembra una variedad susceptible y si el aislamiento tiene buena patogenicidad se observan los síntomas en la haza germinación y el marchitamiento de las plántulas. Otro medio para obtener inóculo, es cáscara de arroz. Se toman 8 litros de cáscara de arroz, 2 lt de una solución que tenga 20 gramos de azúcar refinada y 1.4 gramos de KNO₃, este medio se coloca en una lata y es esterilizado 2 tiempos de una hora a 121°C; después se toman 2 cajas de petri con esclerocios maduros y se licuan en 100 ml de H₂O destilada estéril, colocándolos a crecer en el medio de cáscara de arroz a temperatura ambiente. Después de unos 15 días se observa el crecimiento de micelio y gran cantidad de esclerocios, los que se usan para inocular. En el caso de no haber cascarilla se puede usar hojas o tallos de frijol u otros tales como granos de avena o trigo. Se puede usar la variedad Sanilac como testigo susceptible. En los ensayos de campo se han utilizado entre 400-500 esclerocios por metro de surco. Colocando al inóculo sobre la semilla en el surco, al momento de la siembra.

Rhizoctonia solani

Aislamiento y purificación

Para la obtención y purificación del patógeno se siguen los mismos procedimientos antes mencionados para Sclerotium rolfsii.

Incremento del inóculo

Se puede incrementar el inóculo licuando 1 caja de hongo en H₂O destilada estéril aplicándolo directamente al medio (arena), en una proporción de 4-5 lts. de arena. Los síntomas se observan en los primeros 10 días de siembra (es muy importante una buena humedad en el suelo para un buen desarrollo del patógeno). También se puede incrementar el inóculo en cáscara de arroz utilizando el mismo método usado para Sclerotium rolfsii. También se puede preparar inóculo utilizando 100 gr de papa cortadas en pequeños pedacitos los que se mezclan con un litro de suelo. La mezcla se esteriliza por unos 25 minutos. Esto se puede hacer colocando 400 gramos de la mezcla en Erlenmeyers de 1 litro de volumen. Después se introduce pedacitos de agar con el hongo procedentes de una caja Petri donde éste ya se ha desarrollado. Después de más o menos dos semanas esta mezcla de pedacitos de papa, suelo y el hongo que ha colonizado la mezcla, se usa para inocular el frijol en suelo del invernadero o del campo. Se usa 2% de este inóculo mezclado con el suelo donde se sembrará el frijol.

Fusarium sp.

Aislamiento y purificación

Para Fusarium sp se sigue el mismo método de cortar trocitos y desinfectar con hipoclorito.

Incremento del inóculo

Se hace sacando esporas del cultivo maduro en cajas de PDA con agua destilada; luego se mezclan estas esporas en el suelo o arena, en una concentración de 1×10^8 macroconidias por litro de suelo. Para medir la concentración se usa un hemacitómetro. Los síntomas se aprecian de 3-5 semanas después de la siembra, las variedades Calima y Red Kidney se pueden utilizar como testigos susceptibles.

Para este complejo de hongos se inoculan en el momento de la siembra y es necesario hacer pruebas de diferentes concentraciones para determinar la concentración de inóculo mas apropiada.

Enfermedades bacterianas del frijol

Para el añublo común causado por Xanthomonas campestris pv. phaseoli y para el añublo de halo causado por Pseudomonas syringae pv. phaseolicola se pueden utilizar métodos similares.

Aislamiento

Mediante hojas con síntomas de añublo, pueden cortarse pedazos de 2-3 mm de diámetro, incluyendo áreas con síntomas y área verde. Los trozos de hoja se desinfectan en Hipoclorito de Sodio al 0.5% o Biclouro de Mercurio al 1% como indica la guía de estudio (Técnicas para el

aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol). Después de lavados los trozos, éstos pueden colocarse en un pequeño mortero con unas gotas de agua destilada estéril, cubriendo los pedacitos para luego proceder a macerarlos con el mango estéril; de la suspensión formada, se pueden pasar mediante una asa, unas gotas a un medio sólido y estriarlas sobre el medio para obtener el crecimiento de colonias de cualquiera de estas bacterias.

El medio más común para incremento de estas bacterias es YCDA que contiene:

Extracto de levadura	(Y)	10 gs	
Carbonato de calcio	(C)	17 gs	
Dextrosa	(D)	10 gs	Para 1 litro de agua
Agar	(A)	20 gs	

Las colonias de X. Campestris pv. phaseoli son de color amarillo y viscosas, pero algunas colonias son de color amarillo, se tornan café o marrón. A estas se les asocia con el llamado añublo fusco. Las colonias de P. Syringae pv. phaseolicola son de color blancuzco y mucosas.

Preparación del inóculo. A partir del crecimiento bacterial en una caja con YCDA, pueden incrementarse muchas cajas. Para esto, mediante una asa, se toca el crecimiento inicial y se esparce sobre una nueva caja con medio, de esta forma se incrementan todas las cajas necesarias.

Para la inoculación, dichas cajas se incrementan 48 horas antes de ésta y se incuban a 28°C. Listo el inóculo, se raspa el medio, puede ser con los dedos, y se recoge sobre agua; debe agitarse lo suficiente para obtener una mezcla homogénea del inóculo.

Una vez preparada la suspensión, mediante la ayuda de un colorímetro basado en densidades ópticas, para lo cual se debe tener una curva calibrada en densidades con concentración de bacterias; de esta forma se lee la concentración del inóculo preparado y se diluye a 5×10 unidades que forman colonias (CFU)/ml. Si no se tiene un espectofotómetro para medir la concentración de las bacterias en el inóculo se puede asumir que 4 platos Petri con la bacteria incubada por 48 horas, se diluyen en 12 litros de agua, que es la capacidad de la bomba y así obtener una concentración de inóculo de 5×10 CFU; o sea que para una hectárea de frijol se necesitan 48 cajas Petri con la bacteria incubada por 48 horas.

Para el patógeno del añublo común, las inoculaciones pueden ser hechas en base a un sólo aislamiento, seleccionado por su mayor virulencia con respecto a otros.

Para el del añublo de halo, las inoculaciones son hechas con mezclas de aislamientos ante la supuesta existencia de varias razas.

Inoculación

Para inoculaciones en invernadero, con el patógeno del añublo común, las plantas se inoculan cuando tienen la primera hoja trifoliada. El método más usado es mediante unas tijeras o cuchillas ajustadas a un cabo con 1,5 cm de separación entre ellas.

Las tijeras se introducen en un beaker que contiene el inóculo; en el foliolo central se hacen dos cortes a cada lado del foliolo, los dos cortes deben separarse 1,5 cm y estos deben alcanzar las venas secundarias pero no la primaria. En los foliolos laterales, también se hace el doble corte pero en los bordes no adyacentes al foliolo central. Con las cuchillas, el inóculo puede colocarse sobre una esponja, humedeciendo ésta para luego colocar los foliolos de la hoja trifoliada sobre la esponja y hacer los cortes con las cuchillas, asegurándose de humedecer con la suspensión los cortes.

Las plantas se colocan en condiciones de 27°C y humedad ambiental, para evaluar las plantas a los 8-10 días después de la inoculación.

Para inoculaciones en campo, se procede a partir del mismo inóculo, asperjándose sobre las plantas mediante bombas micronizer o una bomba que alcance presiones de 120 lb/pulg². Estas inoculaciones deben hacerse con una alta humedad en el campo y preferiblemente después de las cinco de la tarde.

Las inoculaciones se repiten cada 10 días hasta la aparición de los síntomas. Generalmente 4 platos con crecimiento de 48 horas dan más o menos 1 litro de inóculo con 5×10^8 de CFU, al que se le agrega agua para completar 12 litros arrojando una nueva concentración de aproximadamente 5×10^7 CFU que se utiliza para inocular plantas en el campo.

En el campo puede usarse el método de las cuchillas, dependiendo de las facilidades operarias.